

国际植物检疫措施标准

第27号国际植检措施标准诊断规程

第X号诊断规程草案： *Plum pox virus*

(201-)

文件草案

出版信息

文件日期	2011年11月2日
文件类型	ISPM 27: 2006 (限定性有害生物诊断规程) 的新附件草案
文件目前所处阶段	2011年10月经标准委员会电子表决, 草案将提交给2012年植物检疫措施委员会第七届会议
缘由	工作计划主题: 病毒与植原体, CPM-1 (2006) (2004-007)
主要阶段	2010年5月批准供成员磋商 2010年6月成员磋商 2011年10月电子表决
备注	文件模板: 国际植物保护公约体例, 2011年10月。页边自动编号

目 录

1. 有害生物信息.....	DPX-5
2. 分类学信息.....	DPX-5
3. 检测与鉴定.....	DPX-6
3.1 生物学检测.....	DPX-7
3.2 血清学检测与鉴定.....	DPX-8
3.2.1 双抗体夹心间接酶联免疫吸附分析.....	DPX-8
3.2.2 双抗体夹心酶联免疫吸附分析.....	DPX-8
3.3 分子检测与鉴定.....	DPX-9
3.3.1 反转录聚合酶链反应.....	DPX-9
3.3.2 免疫捕获反转录聚合酶链反应.....	DPX-10
3.3.3 协同反转录聚合酶链反应.....	DPX-10
3.3.4 实时反转录聚合酶链反应.....	DPX-11
4. 株系鉴定.....	DPX-13
4.1 株系的血清学鉴定.....	DPX-14
4.2 株系的分子鉴定.....	DPX-15
4.2.1 反转录聚合酶链反应.....	DPX-15
4.2.2 免疫捕获反转录聚合酶链反应.....	DPX-15
4.2.3 协同反转录聚合酶链反应.....	DPX-15
4.2.4 实时反转录聚合酶链反应.....	DPX-16
5. 记 录.....	DPX-17
6. 获取进一步信息的联系点.....	DPX-17
7. 致 谢.....	DPX-18
8. 参考文献.....	DPX-19

[1] 1. 有害生物信息

[2] 李痘疱病是为害坚果类果树最重要的病害之一。该病害由 *Plum pox virus*（洋李痘疱病毒，简写名PPV）引起，为害李属植物。特别是对杏（*P. armeniaca*）、欧洲李子（*P. domestica*）、日本李子（*P. persica*）和桃（*P. salicina*）可造成毁灭性危害，由于该病害降低了果实品质并导致果实在成熟前落果。预计自1970年以来，世界范围内防治李痘疱病的费用在100亿欧元以上（Cambra *et al.*, 2006b）。

[3] 李痘疱病最早于1917—1918年报道见于保加利亚欧洲李子，并在1932年被描述为病毒病。此后，该病毒逐渐传播到欧洲大部分地区，沿地中海平原地区以及近东和远东地区。在南美和北美局部地区也发现了该病毒的分布（EPPO, 2006; CABI, 2011）。

[4] PPV是马铃薯Y病毒科马铃薯Y病毒属的一个成员。病毒粒子为约700nm×11nm的线状体，包含一条单链的RNA分子，该RNA分子由近10000个核苷酸组成，并包被在由多达2000个亚基构成的单一外壳蛋白中（García and Cambra, 2007）。PPV在田间由蚜虫以一种非持久性方式传播，但是经感染了病毒的植物繁殖材料的携带而传播是PPV远距离传播的主要途径。

[5] PPV的分离物目前分为7个型或株系：D(Dideron)、M(Marcus)、C(Cherry)、EA(ElAmar)、W(Winona)、Rec(重组型)和T(土耳其型)等（Candresse and Cambra, 2006; James and Glasa, 2006; Ulubaş Serçe *et al.*, 2009）。大多数PPV的分离物均属于D和M型。PPV的D和M型株系都很容易侵染杏和欧洲李子，但是它们对日本李子栽培品种的侵染能力不同。不同株系致病力不同，例如M型在一般情况下在侵染杏、欧洲李子、日本李子和桃时比D型的分离物引起的病害流行速度更快、症状更严重。EA型分离物地理分布上仅局限于埃及，有关其流行病学和生物学特性的信息很少。最近，在几个欧洲国家已经鉴定出了侵染甜樱桃（*P. avium*）和酸樱桃（*P. cerasus*）的PPV的分离物。这些分离物组成了一个独特的类型并被定义为PPV-C。从加拿大的欧洲李子上分离出一种非典型的 *Plum pox virus*（PPV-W），代表了一种独特的PPV类型。此外，已经将PPV的D型和M型自然重组形成的重组型描述为PPV-Rec，该重组型表现出与D型类似的病害流行病学行为。最近，土耳其报道了第二种重组型分离物（T型）。

[6] 关于PPV更多的信息，包括对其病害症状的描述，可参考Barba等（2011）、CABI（2011）、EPPO（2004）、EPPO（2006）、García and Cambra（2007）和PaDIL（2011）等文献。

[7] 2. 分类学信息

名称:	<i>Plum pox virus</i> （简写名PPV）
别名:	莎卡（Sharka）病毒
分类学位置:	马铃薯Y病毒科，马铃薯Y病毒属
通用名:	莎卡（Sharka），李痘疱病。

[8] 3. 检测与鉴定

[9] 在自然条件下，PPV很容易侵染用于商品品种或砧木的李属果树：杏、红叶李（*P. cerasifera*）、山桃（*P. davidiana*）、欧洲李子、mahaleb樱桃（*P. mahaleb*）、marianna李（*P. Marianna*）、梅（*P. mume*）、日本李子、桃及其种间杂交种。甜樱桃、酸樱桃和扁桃（*P. dulcis*）偶尔也可能被侵染。这种病毒还可侵染许多野生和园艺李属植物，如西方沙樱桃（*P. besseyi*）、紫色沙樱桃（*P. cistena*）、麦李（*P. glandulosa*）、布拉斯李（*P. insititia*）、月桂樱桃（*P. laurocerasus*）、黑刺李（*P. spinosa*）、毛樱桃（*P. tomentosa*）和榆叶梅（*P. triloba*）。在实验条件下，PPV可以通过机械接种传播到许多李属植物和一些草本植物上（*Arabidopsis thaliana*、*Chenopodium foetidum*、*Nicotiana benthamiana*、*N. glutinosa*、*N. clevelandii*和*Pisum sativum*）。

[10] PPV的症状可能在田间植株的叶、根、皮、花瓣、果实和果核上出现。叶部的症状在生产季节早期一般很明显，包括中度至浅绿色的褪色；斑驳点、条带或褪色环；叶脉褪绿或黄化；或者叶片变为畸形。某些叶部症状与其他病毒如美洲李线纹病毒（*American plum line pattern virus*）引起的相似。红叶李的GF 31栽培品种表现出锈棕色树皮裂纹。当某些品种的日本李子感染M型或麦李感染D型PPV时，花部的症状能够出现在花瓣上（褪色）。受感染的果实出现斑驳点或轻度的浅色黄环或线状纹。果实可能会变形，呈不规则状并在其褪色环内形成褐色或坏死区域。一些果实，特别是杏和欧洲李子果实的畸形症状和苹果褪绿叶斑病毒（*Apple chlorotic leaf spot virus*）引起的症状相似。染病果实可能出现内部褐色和果肉的胶质化并降低品质。在严重情况下，染病果实在成熟前就会从树上掉落。一般早熟品种的果实表现的症状比那些晚熟品种的更显著。杏的染病果实的果核表现出典型的浅色的环或斑。这些染病果实中产生了酒精或其他的刺激物，导致果实异味而丧失市场价值。症状发展和严重程度主要取决于寄主植物和气候条件，例如该病毒在寒冷气候下可潜隐数年。

[11] ISPM 31:2008（货物抽样方法）提供了抽样方法的一般性指导。适当的样本筛选对于PPV的检测很关键。抽样应考虑病毒生物学和当地气候条件，特别是生长季节的天气情况。如果出现了典型症状，可采集表现症状的花、叶片或果实。对于没有显示症状的植物样本，必须从植株每一个分叉的中部采集至少一年生以上的带有成熟叶片或完全展开叶片的老枝条（对生长1年以下的嫩茎所作的检测并不可靠）。至少应从每株植物的4个不同的位置（例如4根枝条或4片树叶）采样；因为PPV的分布不均匀，这一点至关重要。不能在最高温度的月份采样。对秋季采集的样品所作的检测不如对春季采集的样品所作的检测可靠。最好从果树植株冠盖的内部采样。在春季，可采集花、带有完全伸展叶片的新发枝条或果实。在夏秋季，从田间或包装室内采集的成熟叶片或者成熟果实的果皮可用于分析。分析处理前，采集的花、枝条

和果皮在4℃下保存不能超过10天。果实可以在处理前在4℃保存1个月。冬天可采集分叉、枝条和细条基部的休眠芽或树皮组织，或者采集完整的芽体。

[12] 可通过生物学、血清学和分子方法来检测PPV；鉴定需要进行血清学或分子检测。至少一种血清学或分子检测是发现并鉴定PPV的最起码的要求（例如在一个国家中对一种广泛分布的有害生物的常规检测）。当国家植保组织（NPPO）要求对PPV的鉴定具有更高的可信度时（例如在没有发生过该病毒的地区或来自宣称没有该有害生物发生的国家的货物中检测到时），可能需要进行进一步的检测。在使用分子方法进行最初鉴定的情况下，后续检测应使用血清学技术，反之亦然。可作进一步的检测以鉴定检测出的PPV的株系。在任何情况下，均必须包括阳性和阴性对照。推荐的检测技术将在下面的章节进行描述。

[13] 在一些情况下（例如在一个国家中对一种广泛分布的有害生物的常规检测）可使用采自多种植物的大样本对多种植物同时进行检测。对一种或多种植物进行检测的决定取决于植株中的病毒浓度和NPPO要求的置信水平。

[14] 在本诊断规程中，各种方法（包含引用的商标名）均按出版要求加以说明，因为它们决定了可获得的灵敏度、特异性和/或可重复性的最初水平。本规程提供的实验室程序可根据各自实验室的标准进行调整，只要它们经过了充分的验证。

[15] 3.1 生物学检测

[16] 用于检测PPV的主要指示植物是红叶李的GF31栽培品种、日本李子的GF305栽培品种、日本李子×山桃的Nemaguard栽培品种，或毛樱桃的幼苗。用种子培育指示植物，将种子播种于透水良好的土壤混合物中，并在18℃和25℃之间的防虫温室中培育，直到植株足够大时（常常直径为3—4mm，高度为25—30cm）进行嫁接。其他李属种类的幼苗也可用作指示植物接穗进行嫁接。指示植物必须按照常规嫁接方法如芽接进行嫁接接种（Desvignes, 1999），每一指示植物至少需四次重复。将嫁接的指示植物放置于同上所述的环境中培育，三周后在其最上部接穗的上端进行几厘米的修剪（Gentit, 2006）。嫁接的植物至少在6周内都要检查症状。修剪后的植株在生长3—4周后，观察新生部分是否出现病毒病症状-特别是斑驳条带和形状，并与阳性和阴性健康对照进行比较。PPV在指示植物上引起的症状的图解可参看Damsteegt等（1997；2007）和Gentit（2006）。

[17] 关于嫁接（检测方法）的专一性、灵敏性和可靠性方面尚未见定量数据的报道。该方法广泛应用于认证检测程序中，并被认为是灵敏的检测方法。但是，该方法不是一个快速检测方法（接种后症状的出现需要几周时间），该方法只可用于检测木芽，且需要专门的设施一如可控制温度的温室，而且观察到的症状可能会与那些通过嫁

接传播的其他病原菌的症状相混淆。另外，有些不显症的株系不会引发症状，因此在指示植物上检测不到。

[18] 3.2 血清学检测与鉴定

[19] 对于大样本的筛选检测，强烈推荐采用酶联免疫吸附检测方法（ELISA）。

[20] 对于样品的处理，将0.2—0.5克左右的新鲜植物材料切成小块并放入大小合适的试管或塑料袋中。使用电动捣碎机、手工研磨棒、锤子或类似工具在4—10ml（1:20重量/容积）提取液中将样品捣碎成匀浆。提取缓冲液是pH7.2—7.4的磷酸盐缓冲剂（PBS），含有2%的聚乙烯基吡咯烷酮和0.2%二甲基二硫代氨基甲酸钠盐（Cambra *et al.*, 1994）或其他经过适当验证的缓冲剂。植物材料必须充分捣匀并立即用于检测。

[21] 3.2.1 双抗体夹心间接酶联免疫吸附分析

[22] 双抗体夹心间接酶联免疫吸附检测（DASI-ELISA），也称之为三抗体夹心酶联免疫吸附检测（(TAS)-ELISA）。根据Cambra等（1994），应该按照试剂盒制造商的实验指南采用专化性的5B-IVIA单克隆抗体来进行检测。

[23] 5B-IVIA目前是可用于检测PPV所有株系的唯一的单克隆抗体，并且具有高度的可靠性、专化性和灵敏性（Cambra *et al.*, 2006a）。在法国和西班牙完成的，由17个实验室采用一组10个样本（受PPV（PPV-D、PPV-M与PPV-D+M）侵染的样品和健康对照）的一个DIAGPRO循环检测结果表明：使用5B-IVIA单克隆抗体进行DASI-ELISA检测精确度是95%（采用该技术检测出的真实阴性数和真实阳性数/检测的样本数）。该精确度比使用免疫捕获反转录聚合酶链反应（IC-RT-PCR）82%或协同RT-PCR（Co-RT-PCR）94%的精确度更高（Cambra *et al.*, 2006c; Olmos *et al.*, 2007）。与使用纯核酸或点样品进行实时RT-PCR的检测率（分别为89.2%和98.0%）及IC-RT-PCR的检测率（96.1%）相比，使用5B-IVIA单克隆抗体进行DASI-ELISA检测的真实阴性率（采用该技术检测出的真实阴性数/健康植株的个数）是99%。Capote等（2009）也报道在冬季使用5B-IVIA单克隆抗体进行DASI-ELISA检测出的某一个阳性结果具有98.8%的概率是真实阳性。

[24] 3.2.2 双抗体夹心酶联免疫吸附分析

[25] 采用常规或生物素/streptavidin双抗体夹心酶联免疫吸附检测（DAS-ELISA）时，应使用基于5B-IVIA单克隆抗体或多克隆抗体的试剂盒，该检测已证明可检测PPV所有株系而不会与其他病毒或健康植物材料产生交叉反应（Cambra *et al.*, 2006a; Capote *et al.*, 2009）。应该按照试剂盒制造商的实验指南来进行检测。

[26] 尽管采用5B-IVIA单克隆抗体可专一地、灵敏地和可靠地检测所有的PPV株系，但某些多克隆抗体不具有专一性并且灵敏度有限(Cambra et al., 1994; Cambra et al., 2006a)。因此，在使用多克隆抗体进行检测，而且国家植保组织对PPV鉴定有更高的可信度要求时，建议进一步采用其他的检测方法。

[27] 3.3 分子检测与鉴定

[28] 与血清学检测方法相比，使用反转录聚合酶链反应（RT-PCR）的分子检测方法可能更加昂贵并更加费时，特别是进行大规模检测时。然而，分子检测方法特别是实时RT-PCR一般比血清学检测方法要灵敏得多。使用实时RT-PCR还减少了扩增反应后的处理过程（例如：凝胶电泳），因而与传统PCR相比更快并减少了污染机会。

[29] 除了免疫捕获（IC）-RT-PCR（该检测不需要提取RNA），应使用合适的有效程序来提取RNA。样品应分置于单个塑料袋中，以免在提取过程中交叉污染。而对于实时RT-PCR，可将圆斑植物提取液、组织印压汁液或挤压出的植物组织汁液移到吸水纸或尼龙膜上进行实时RT-PCR检测（Olmos et al., 2005; Osman and Rowhani, 2006; Capote et al., 2009）。在常规RT-PCR检测中，不提倡采用圆斑或挤压的植物汁液样本，因为常规RT-PCR检测灵敏度比实时RT-PCR的要低。

[30] 每种方法给出了用作一个模板的提取物的数量。取决于方法的灵敏度，检测PPV所要求的模板的最低浓度变化如下：RT-PCR，100 fg RNA模板 ml^{-1} ；Co-RT-PCR，1 fg RNA模板 ml^{-1} ；和实时RT-PCR，2 fg RNA模板 ml^{-1} 。

[31] 3.3.1 反转录聚合酶链反应

[32] 在该检测中采用的RT-PCR引物是Wetzel等（1991）发表的引物：

P1（5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3'）

P2（5'-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3'）。

或者是Levy和Hadidi（1994）发表的引物：

3'NCR正义（5'-GTA GTG GTC TCG GTA TCT ATC ATA-3'）

3'NCR反义（5'-GTC TCT TGC ACA AGA ACT ATA ACC-3'）。

[33] 25 μl 的反应混合物组成如下：1 μM 的每对引物（P1/P2或3'NCR引物对）、250 μM dNTPs、1单位的AMV反转录酶、0.5单位的Taq DNA聚合酶、2.5 μl 10 \times Taq聚合酶缓冲液、1.5 mM MgCl_2 、0.3% Triton X-100和5 μl RNA模板。在如下的热循环条件下进行反应：42 $^{\circ}\text{C}$ 45分钟，94 $^{\circ}\text{C}$ 2分钟，进行40个循环的94 $^{\circ}\text{C}$ 30秒、60 $^{\circ}\text{C}$ 30秒（P1/P2引物）或62 $^{\circ}\text{C}$ 30秒（3'NCR引物）和72 $^{\circ}\text{C}$ 1分钟。随后在72 $^{\circ}\text{C}$ 进行10分钟的最后扩展。对PCR产物进行凝胶电泳分析。以P1/P2和3'NCR为引物的PCR产物分别产生一个243碱基对和220碱基对的扩增片段。

[34] 通过检测来源于地中海地区（塞浦路斯、埃及、法国、希腊、西班牙和土耳其）的PPV分离物对Wetzel等（1991）的检测方法进行了评估。该检测方法可以检测出10 fg的病毒RNA，相当于2 000个病毒粒子（Wetzel *et al.*, 1991）。对Levy和Hadidi（1994）的检测方法的评估是通过检测来源于埃及、法国、德国、希腊、匈牙利、意大利、西班牙和罗马尼亚的PPV分离物而进行的。

[35] 3.3.2 免疫捕获反转录聚合酶链反应

[36] 必须按照Wetzel等（1992）的方法进行免疫捕获阶段的反应，即采用在3.2.节中所描述的植物汁液提取液，并使用单独的试管或塑料袋以避免污染。

[37] 用pH9.6的碳酸盐缓冲液制备多克隆抗体或PPV专化性单克隆抗体（5B-IVIA）稀释液（1 μ g ml⁻¹）。将100 μ l稀释抗体液加入PCR管中并在37 $^{\circ}$ C孵育3小时。用无核酸酶水冲洗试管两次，移取100 μ l的植物提取液（见3.2节）进行离心（15 500 \times g，5分钟），将离心后的上清液加入已被（抗体）包被的PCR管中。在冰上或37 $^{\circ}$ C孵育2小时。用150 μ l无菌PBS-Tween液将离心管清洗3次。按照3.3.1节所描述的程序制备RT-PCR反应混合液，采用Wetzel等（1992）发表的引物，将RT-PCR反应混合液直接加入到已包被的PCR管中，根据3.3.1节所叙述的程序进行（RT-PCR）扩增。

[38] IC-RT-PCR一般要求使用专化性抗体，尽管直接结合的方法可以取消这一要求。使用5B-IVIA单克隆抗体，对免疫捕获RT-PCR进行了一个DIAGPRO循环检测评估，结果表明对PPV的检测准确率为82%（Cambra *et al.*, 2006c; Olmos *et al.*, 2007）。Capote等（2009）报道在冬季使用5B-IVIA单克隆抗体进行免疫捕获RT-PCR检测出的某一个阳性结果具有95.8%的概率是真实阳性。

[39] 3.3.3 协同反转录聚合酶链反应

[40] 在协同（Co）-RT-PCR检测中使用的RT-PCR引物是Olmos、Bertolini和Cambra等（2002）提出的：

内部引物P1（5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3'）

内部引物P2（5'-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3'）

外部引物P10（5'-GAG AAA AGG ATG CTA ACA GGA-3'）

外部引物P20（5'-AAA GCA TAC ATG CCA AGG TA-3'）。

[41] 25 μ l的反应混合物组成如下：0.1 μ M的 P1和P2引物、0.05 μ M的P10和P20引物、400 μ M dNTPs、2单位的AMV反转录酶、1单位的Taq DNA聚合酶、2 μ l 10 \times 反应缓冲液、3 mM MgCl₂、5% DMSO、0.3% Triton X-100和5 μ l RNA模板。在如下的热循环条件下进行RT-PCR反应：42 $^{\circ}$ C 45分钟，94 $^{\circ}$ C 2分钟，进行60个循环的94 $^{\circ}$ C 15秒、50 $^{\circ}$ C 15秒、72 $^{\circ}$ C 30秒。随后72 $^{\circ}$ C进行10分钟的最后扩展。

[42] 将RT-PCR反应与采用3' digoxigenin (DIG) 一标记的PPV广谱探针 (5'-TCG TTT ATT TGG CTT GGA TGG AA-DIG-3'') 检测扩增片段的色谱检测仪相连接。将扩增的cDNA 95°C处理5分钟并迅速置于冰上进行变性。取1 µl的样品于尼龙膜上。室温下干燥尼龙膜并在导光透明器中245 nm处理4分钟进行紫外杂交连接。预杂交：将尼龙膜放入使用标准杂交缓冲液的杂交试管中，60°C下孵育1小时。倒掉溶液后，使用3''DIG-标记的探针与最终浓度为10 pmol ml⁻¹的标准杂交混合液进行杂交，60°C下孵育2小时。在室温下，用2×清洗液15分钟清洗尼龙膜2次，并用0.5×清洗液15分钟再清洗尼龙膜2次。在采用1% (1g封闭剂溶解于100ml马来酸缓冲液中) 的无菌封闭液封闭30分钟前，将尼龙膜放入清洗缓冲液中平衡2分钟。用含有1:5 000 (150单位/升) 抗-DIG-碱性磷酸酶联合抗体的1%封闭混合液 (重量/容积) 室温下孵育尼龙膜30分钟。用清洗液洗尼龙膜15分钟两次，并用检测缓冲液 (100 mM Tris-HCl、100 mM氯化钠，pH 9.5) 平衡2分钟。通过将45 µl NBT溶液 (75 mg ml⁻¹ nitro blue tetrazolium salt in 70% (容积/容积) dimethyl formamide) 和35 µl BCIP 溶液 (50 mg ml⁻¹ 5-bromo-4chloro-3indolyl phosphate toluidinium salt in 100% dimethyl formamide) 混合在10 ml的检测缓冲液中而制备反应底物。与底物孵育1小时后，用清水清洗来停止反应。

[43] 该检测方法比Wetzel等 (1991) 的RT-PCR要灵敏100倍以上 (Olmos、Bertolini and Cambra *et al.*, 2002)。对该检测方法进行了一个DIAGPRO循环检测评估，结果表明检测准确率为94% (Cambra *et al.*, 2006c; Olmos *et al.*, 2007)。

[44] 3.3.4 实时反转录聚合酶链反应

[45] 可以使用TaqMan或SYBR Green I (试剂盒) 来进行实时RT-PCR。已有两种TaqMan方法用于广泛地检测PPV (Schneider *et al.*, 2004; Olmos *et al.*, 2005)。第一种用于检测的引物和TaqMan探针是由Schneider等 (2004) 报道的：

正向引物 (5''-CCA ATA AAG CCA TTG TTG GAT C-3'')

反向引物 (5''-TGA ATT CCA TAC CTT GGC ATG T-3'')

TaqMan探针 (5''-FAM-CTT CAG CCA CGT TAC TGA AAT GTG CCA-TAMRA-3'')

[46] 25 µl的反应混合物组成如下：1×反应混合液 (0.2mM of每种dNTP and 1.2 mM MgSO₄)、200 nM of正向和反向引物、100 nM TaqMan探针、4.8 mM MgSO₄、0.5 µl RT/Platinum[®] Taq混合液 (Superscript[™] One-Step RT-PCR with Platinum[®] Taq kit Invitrogen)¹和5 µl RNA模板。按照以下的热循环条件下进行RT-PCR反应：52°C 15分钟，95°C 5分钟，进行60个循环的95°C 15秒、60°C 30秒。根据设备制造商的实验指南对PCR产物进行实时分析。

¹ 本诊断规程使用 Invitrogen 牌 Superscript[™] One-Step RT-PCR with Platinum[®] Taq 试剂盒并非意味着批准这些产品而将可能也适用的其它产品排除在外。提供这种信息是为了便利本规程的用户，并不表示植检委认可提到的化学品、试剂和/或设备。可以使用表明能够产生相同结果的等同产品。

[47] 通过检测来源于美国的PPV分离物及其株系C, D, EA和M型以及8个其他病毒对Schneider等(2004)报道的检测方法进行了评估。该检测方法具有专一性并可稳定地检测出10—20 fg的病毒RNA (Schneider *et al.*, 2004)。该方法还可检测出几种寄主中以及日本李子的叶子、茎部、芽和根部的PPV。

[48] 第二种检测方法的引物和TaqMan探针是由Olmos等(2005)等报道的:

P241引物 (5'-CGT TTA TTT GGC TTG GAT GGA A-3')

P316D引物 (5'-GAT TAA CAT CAC CAG CGG TGT G-3')

P316M引物 (5'-GAT TCA CGT CAC CAG CGG TGT G-3')

PPV-DM探针 (5'-FAM-CGT CGG AAC ACA AGA AGA GGA CAC AGA-TAMRA-3')。

[49] 25µl的反应混合物组成如下: 1µM的P241引物、0.5 µM各种P316D和P316M引物、200 nM TaqMan探针、1×TaqMan广谱PCR Master混合液 (Applied Biosystems)²、1×MultiScribe 和RNase抑制混合液 (Applied Biosystems)³和5 µl的RNA模板。按照以下的热循环条件下进行RT-PCR反应: 48°C 30分钟, 95°C 10分钟, 进行40个循环的95°C 15秒、60°C 60秒。根据设备制造商的实验指南对PCR产物进行实时分析。

[50] 通过检测PPV-D和PPV-M的每个株系的3个分离物对Olmos等(2005)的检测方法进行了评估, 该检测方法的灵敏度比采用5B-IVIA单克隆抗体的DASI-ELISA检测法的高1 000倍以上。与使用斑点取样实时RT-PCR的检测率(93.6%)、免疫捕获RT-PCR的检测率(91.5%)或使用5B-IVIA单克隆抗体的DASI-ELISA的检测率(86.6%) (Capote *et al.*, 2009)相比, 采用实时TaqMan和提纯核酸进行实时RT-PCR检测的真实阳性率(由该技术检测出的真实阳性数/受PPV侵染的植株数)是97.5% (Olmos *et al.*, 2005)。

[51] Varga和James (2005)描述了一种快速检测PPV和鉴定D和M株系的SYBR Green I (试剂盒)检测方法:

P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3')

PPV-U (5'-TGA AGG CAG CAG CAT TGA GA-3')

PPV-FD (5'-TCA ACG ACA CCC GTA CGG GC-3')

PPV-FM (5'-GGT GCA TCG AAA ACG GAA CG-3')

PPV-RR (5'-CTC TTC TTG TGT TCC GAC GTT TC-3')。

² 本诊断规程使用 Applied Biosystems 牌 TaqMan Universal PCR Master Mix, 以及 MultiScribe 和 RNase 抑制剂混合液, 并非意味着批准这些产品而将可能也适用的其它产品排除在外。提供这种信息是为了便利本规程的用户, 并不表示植检委认可提到的化学品、试剂和/或设备。可以使用表明能够产生相同结果的等同产品。

³ 见脚注 2

[52] 可能需要包括下列的内部控制引物来保证检测反应正确地进行：

Nad5-正向（5'-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3'）

Nad5-反向（5'-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3'）。

[53] 采用的是一种两步RT-PCR的程序。反转录（RT）反应混合物组成如下：2 μ l的10 μ M MP1引物、2 μ l的10 μ M Nad5-R引物、4 μ g总RNA和5 μ l水。72 $^{\circ}$ C孵育5分钟，放在冰块中。加入4 μ l 5 \times 第一链缓冲液（Invitrogen）⁴，2 μ l 0.1 M DTT，1 μ l 10 mM dNTPs，0.5 μ l RNaseOUT™（40单位 μ l⁻¹）（Invitrogen）⁵，1 μ l Superscript™ II（Invitrogen）⁶和2.5 μ l水。42 $^{\circ}$ C孵育60分钟，然后99 $^{\circ}$ C孵育5分钟。24 μ l的反应混合物组成如下：400nM PPV-U引物，350nM PPV-FM引物，150nM PPV-FD引物，200nM PPV-RR引物，100nM Nad5-F引物，100nM Nad5-R引物，200 μ M dNTPs，2mM MgCl₂，1 \times Karsai缓冲液（Karsai *et al.*, 2002），1:42000 SYBR Green I（Sigma）⁷和0.1 μ l Platinum® Taq DNA高纯度聚合酶（Invitrogen）。将反应混合液和1 μ l的cDNA（1:4）加入无菌PCR管中。按照以下的热循环条件下进行PCR反应：95 $^{\circ}$ C 2分钟，进行39个循环的95 $^{\circ}$ C 15秒和60 $^{\circ}$ C 60秒。熔点曲线分析通过60 $^{\circ}$ C至95 $^{\circ}$ C以0.1 $^{\circ}$ C s⁻¹的速度进行孵育而进行的，从而得到平均为1点的平滑曲线。根据Varga和James（2005）确定的条件，每个产物的熔解温度是：

广谱PPV检测（74 bp片段）：80.08–81.52 $^{\circ}$ C

D株系（114 bp片段）：84.3 – 84.43 $^{\circ}$ C

M株系（380 bp片段）：85.34 – 86.11 $^{\circ}$ C

内部控制（181 bp片段）：82.45 – 82.63 $^{\circ}$ C

[54] 通过检测在烟草属（*Nicotiana*）和李属植物上的PPV-C、PPV-D、PPV-EA、PPV-M型以及一个未鉴定株系的分离物，对Varga和James（2005）的检测方法进行了评估。

[55] 4. 株系鉴定

[56] 本节描述用于PPV株系鉴定的其他方法（使用DASI-ELISA，RT-PCR，Co-RT-PCR和实时RT-PCR）（见图1）。PPV鉴定并非一定要分辨出该病毒的株系，但是国家植物保护组织可能希望对该病毒的株系进行鉴定，以有利于预测该病毒的流行病学行为。

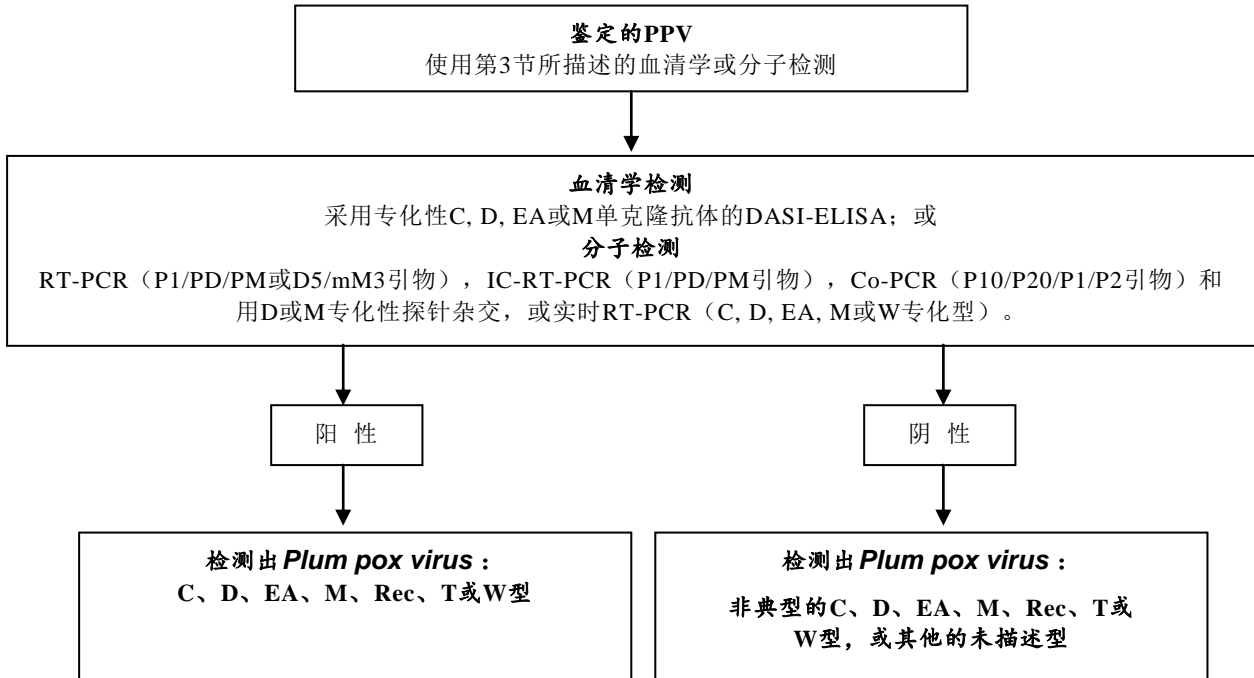
⁴ 本诊断规程使用 Invitrogen 牌 first strand buffer、RNaseOUT™、Superscript™ II and Platinum® Taq DNA 高保真聚合酶，并非意味着批准这些产品而将可能也适用的其它产品排除在外。提供这种信息是为了便利本规程的用户，并不表示植检委认可提到的化学品、试剂和/或设备。可以使用表明能够产生相同结果的等同产品。

⁵ 见脚注 4

⁶ 见脚注 4

⁷ 本诊断规程使用 Sigma 牌 SYBR Green I，并非意味着批准这些产品而将可能也适用的其它产品排除在外。提供这种信息是为了便利本规程的用户，并不表示植检委认可提到的化学品、试剂和/或设备。可以使用表明能够产生相同结果的等同产品。

[57] 考虑到PPV的变异性，除了基因序列测定或某些以PCR为基础的检测方法外（见下文）的其他方法对小部分分离物的检测有可能产生错误结果。但是，根据下面所描述的血清学或分子检测方法，一般情况下可以鉴定出D和M型的PPV（Candresse and Cambra, 2006; Capote *et al.*, 2006）。



[58] **图1：**鉴定 *Plum pox virus* 株系的方法

[59] 当国家植物保护组织对鉴定PPV的株系有更高可信度的要求时，可能需要进行进一步的检测。在检测病毒的非典型型或未描述型时，可测定PPV基因组的全序列或外壳蛋白、P3-6K1和细胞质内含蛋白基因的全序列或部分序列。

[60] 4.1 株系的血清学鉴定

[61] 应根据Cambra等(1994)的检测方法，采用D和M专化型的单克隆抗体（Cambra *et al.*, 1994; Boscia *et al.*, 1997），按照试剂盒制造商的实验指南应用DASI-ELISA来区分PPV的两种主要型（D和M）。

[62] 通过DIAGPRO循环检测程序对该检测方法进行了评估，结果表明：对PPV-D型的检测鉴定精确度是84%、M型的是89%（Cambra *et al.*, 2006c; Olmos *et al.*, 2007）。4D单克隆抗体是PPV-D型专化型的，但并非与所有的PPV-D型分离物都有反应。此外，由于这几个组具有相同的外壳蛋白基因序列，用于检测PPV-M型的AL单克隆抗体与属于PPV的M、Rec和T型的分离物均有反应。因此，需要再使用一个M专化型的单克隆抗体通过分子检测来区分M、Rec和T型。

[63] 使用EA和/或C专化性单克隆进行DASI-ELISA, 对PPV的EA和C组分离物的血清学鉴定已由Myrta等(1998, 2000)报道过。然而, 这些检测方法需要得到验证。

[64] 4.2 株系的分子鉴定

[65] 4.2.1 反转录聚合酶链反应

[66] 采用Olmos等(1997)报道的引物鉴定PPV-D和PPV-M型:

P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3')

PD (5'-CTT CAA CGA CAC CCG TAC GG-3') 或PM (5'-CTT CAA CAA CGC CTG TGC GT -3')。

[67] 25 μ l的反应混合物组成如下: 1 μ M的P1引物、1 μ M的PD或PM引物、250 μ M dNTPs、1单位AMV反转录酶(10单位 μ l⁻¹)、0.5单位Taq DNA聚合酶(5单位 μ l⁻¹)、2.5 μ l 10 \times Taq聚合酶缓冲液、1.5mM MgCl₂、0.3% Triton X-100、2% formamide和5 μ l RNA模板。按照以下的热循环条件下进行RT-PCR反应: 42 $^{\circ}$ C 45分钟, 94 $^{\circ}$ C 2分钟, 进行40个循环的94 $^{\circ}$ C 30秒、60 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 1分钟, 随后在72 $^{\circ}$ C 进行10分钟最后的扩展。通过凝胶电泳对PCR产物进行分析。P1/PD和P1/PM引物产生一个198碱基对的扩增片段。通过检测6个PPV-D型分离物和4个PPV-M型分离物对该检测方法进行了评估。

[68] 采用Šubr等(2004)报道的mD5/mM3 Rec-专化型引物鉴定PPV-Rec型:

mD5 (5'-TAT GTC ACA TAA AGG CGT TCT C-3')

mM3 (5'-CAT TTC CAT AAA CTC CAA AAG AC-3')。

[69] 25 μ l的反应混合物组成如下(根据Šubr *et al.*, 2004修订): 1 μ M 的各种引物、250 μ M dNTPs、1单位AMV反转录酶(10单位 μ l⁻¹)、0.5单位Taq DNA聚合酶(5单位 μ l⁻¹)、2.5 μ l 10 \times Taq聚合酶缓冲液、2.5mM MgCl₂、0.3% Triton X-100和5 μ l RNA提取液(见3.3节)。通过凝胶电泳分析检测PCR产生的605碱基对的扩增片段。

[70] 4.2.2 免疫捕获反转录聚合酶链反应

[71] 按照3.3.2节所描述的方法进行免疫捕获。将PCR反应混合液直接加入已包被的PCR管中。按照4.2.1节所描述的方法进行PPV-D型和PPV-M型的检测鉴定。

[72] 4.2.3 协同反转录聚合酶链反应

[73] 采用PPV-D和PPV-M型株系专化性的3'^{''}DIG-标记探针, 按照3.3.3节所描述的检测方法可以鉴定PPV-D和PPV-M株系(Olmos, Bertolini and Cambra, 2002):

PPV-D专化性探针: 5'-CTT CAA CGA CAC CCG TAC GGG CA-DIG-3'^{''}

PPV-M专化性探针: 5'-AAC GCC TGT GCG TGC ACG T-DIG-3'^{''}。

[74] 采用标准预杂交和杂交缓冲液+30%甲酰胺（用于PPV-D株系的鉴定）或+50%甲酰胺（PPV-M株系的鉴定）在50℃完成预杂交和杂交步骤。采用2%（w/v）的封闭液。

[75] 4.2.4 实时反转录聚合酶链反应

[76] 采用SYBR Green I试剂盒按照Varga和James（2005）的方法（见3.3.4节）或Capote等（2006）所描述的TaqMan法可以特异性鉴定PPV-D和PPV-M株系。

[77] 在Capote等（2006）的检测方法中使用的引物和TaqMan探针是：

PPV-MGB-正向引物（5'-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3''）

PPV-MGB-反向引物（5'-CTC AAT GCT GCT GCC TTC AT-3''）

MGB-D探针（5'-FAM-TTC AAC GAC ACC CGT A-MGB-3''）

MGB-M探针（5'-FAM-TTC AAC AAC GCC TGT G-MGB-3''）。

[78] 25 μl的反应混合物组成如下：1μM的各种引物、150nM MGB-D或MGB-M FAM探针、1×TaqMan广谱PCR Master混合液（Applied Biosystems）⁸、1×MultiScribe and RNase抑制剂混合液（Applied Biosystems）⁹和5μl RNA模板（见3.3节）。按照以下的热循环条件进行RT-PCR反应：48℃ 30分钟，95℃ 10分钟，进行40个循环的95℃ 15秒、60℃ 60秒。按照试剂盒制造商提供的实验指南对PCR产物进行实时分析。通过对分别来源于PPV-D和PPV-M型的12个分离物和这两个株系混合侵染的14个样本的检测试验对该检测方法进行了评估。

[79] 采用SYBR Green I化学公司试剂盒，按照Varga和James（2006）的方法可特异性地鉴定PPV-C、PPV-EA和PPV-W株系。该方法采用的引物是：

P1（5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3''）

PPV-U（5'-TGA AGG CAG CAG CAT TGA GA-3''）

PPV-RR（5'-CTC TTC TTG TGT TCC GAC GTT TC-3''）。

[80] 可以添加以下的内部控制引物以确保检测反应的正确进行：

Nad5-正向（5'-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3''）

Nad5-反向（5'-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3''）。

[81] 25μl 的反应混合物组成如下：2.5μl的1/10（容积/容积）水稀释的RNA提取液（见3.3节）和22.5μl的主混合液。该混合液有以下成分：2.5μl的Karsai缓冲液（Karsai *et al.*, 2002）；0.5μl的各种5μM引物PPV-U, PPV-RR or P1, Nad5R and Nad5F；

⁸ 本诊断规程使用 Applied Biosystems 牌 TaqMan Universal PCR Master Mix 以及 MultiScribe 和 RNase 抑制剂混合液，并非意味着批准这些产品而将可能也适用的其它产品排除在外。提供这种信息是为了便利本规程的用户，并不表示植检委认可提到的化学品、试剂和/或设备。可以使用表明能够产生相同结果的等同产品。

⁹ 见脚注 8

0.5 μ l的10mM dNTPs；1 μ l的50mM MgCl₂；0.2 μ l的RNaseOUT™（40单位 μ l⁻¹；Invitrogen）¹⁰；0.1 μ l的Superscript™ III（200单位 μ l⁻¹；Invitrogen）¹¹；0.1 μ l的Platinum® Taq DNA高纯度聚合酶（5 units μ l⁻¹，Invitrogen）¹²；和1 μ l的1:5 000（in TE, pH7.5）SYBR Green I（Sigma）¹³溶于16.1 μ l的水中。按照以下的热循环条件下进行反应：50℃ 10分钟，95℃ 2分钟，进行29个循环的95℃ 15秒、60℃ 60秒。熔点曲线分析通过在60℃至95℃以0.1℃ s⁻¹的速度进行孵育而进行的，从而得到平均为1点的平滑曲线。根据Varga和James（2006）确定的条件，每个（PCR）产物熔解温度是：

C株系（74 bp片段）：79.84℃

EA株系（74 bp片段）：81.27℃

W株系（74 bp片段）：80.68℃。

[82] 采用PPV-C、PPV-D、PPV-EA和PPV-W株系的一种分离物对该检测方法进行了评估。

[83] 5. 记录

[84] 在ISPM 27：2006的第2.5节规定了所需要保存的记录。

[85] 在签约方可能受检测结果影响的情况下，特别是出现违规和在某一地区首次发现该病毒时，必须特别地要求保存以下材料：

- 将原始样本（正确标记以备追溯）冷冻保存在-80℃或冷冻干燥后室温保存。
- 如有必要，可将RNA提取液保存在-80℃和/或将纸或尼龙膜上的圆斑取样植物提取液或植物组织印压汁液室温保存。
- 如有必要，可将RT-PCR扩增产物保存在-20℃。

[86] 6. 获取进一步信息的联系点

美国动植物检疫局植物保护及检疫处 PHP RIPPS 分子诊断实验室，BARC 大厦
580号，Beltsville，马里兰，美国，20705（Laurene Levy 博士，e-mail：
Laurene.Levy@aphis.usda.gov；电话：+1 3015045700；传真：
+1 3015046124）。

¹⁰ 本诊断规程使用 Invitrogen 牌 RNaseOUT™，Superscript™ II and Platinum® Taq DNA 高保真聚合酶，并非意味着批准这些产品而将可能也适用的其它产品排除在外。提供这种信息是为了便利本规程的用户，并不表示植检委认可提到的化学品、试剂和/或设备。可以使用表明能够产生相同结果的等同产品。

¹¹ 见脚注 10。

¹² 见脚注 10。

¹³ 本诊断规程使用 Sigma 牌 SYBR Green I，并非意味着批准这些产品而将可能也适用的其它产品排除在外。提供这种信息是为了便利本规程的用户，并不表示植检委认可提到的化学品、试剂和/或设备。可以使用表明能够产生相同结果的等同产品。

国家农业研究院病毒系 (INRA), 波尔多中心, UMR GD2P, IBVM, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon Cedex, 法国 (Thierry Candresse 博士, e-mail: tc@bordeaux.inra.fr; 电话: +33 557122389; 传真: +33 557122384)。

科温纽斯大学 (Corvinus University) 植物病理系园艺科学组, Villányi út 29-43, H-1118 布达佩斯, 匈牙利 (Laszlo Palkovics 博士, e-mail: laszlo.palkovics@uni-corvinus.hu; 电话: +36 14825438; 传真: +36 14825023)。

斯洛伐克科学院病毒研究所, Dúbravská, 84505 Bratislava, 斯洛伐克 (Miroslav Glasa 博士, e-mail: virumig@savba.sk; 电话: +421 259302447; 传真: +421 254774284)。

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) 植物保护与生物技术中心, Carretera Moncada-Náquera km 5, 46113 Moncada (Valencia), 西班牙 (Mariano Cambra 博士, e-mail: mcambra@ivia.es; 电话: +34 963424000; 传真: +34 963424001)。

Istituto di Virologia Vegetale del CNR, sezione di Bari, via Amendola 165/A, I-70126 Bari, 意大利 (Donato Boscia 博士, e-mail: d.boscia@ba.ivv.cnr.it; 电话: +39 0805443067; 传真: +39 0805442911)。

加拿大食品检验局 (CFIA) Sidney 实验室, 不列颠哥伦比亚, V8L 1H3 Sidney, 加拿大 (Delano James 博士, e-mail: Delano.James@inspection.gc.ca; 电话: +1 250 3636650; 传真: +1 250 3636661)。

果树和蔬菜职业技术中心 (CTIFL) 病毒实验室, BP21 Lanxade, F-24130 La Force, 法国 (Pascal Gentit 博士, e-mail: gentit@ctifl.fr; 电话: +33 553580005; 传真: +33 553 581742)。

[87] 7. 致谢

[88] 本检测规程由IVIA (见上节) 的M. Cambra、A. Olmos和N. Capote博士, 南非农业、林业与渔业部的N. L. Africander先生 (个人信箱X 5015, Stellenbosch, 75999, 南非); L. Levy博士 (见前节); 阿根廷的S. L. Lenardon博士 (IFFIVE-INTA, Cno. 60 Cuadras Km 51/2, Córdoba X5020ICA, 阿根廷); 新西兰的G. Clover博士 (植物健康与环境, 农业与林业部, 邮政信箱2095, Auckland 1140, 新西兰) 和英国的D. Wright女士 (植物健康组, 中央科学实验室, Sand Hutton, 约克YO41 1LZ, 英国) 起草。

[89] 8. 参考文献

- Barba, M., Hadidi, A., Candresse, T. & Cambra, M. 2011. *Plum pox virus*. In: A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse & W. Jelkmann, eds. *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*, Chapter 36. St. Paul, MN, APS Press. 428 pp.
- Boscia, D., Zeramdini, H., Cambra, M., Potere, O., Gorris, M.T., Myrta, A., DiTerlizzi, B. & Savino, V. 1997. Production and characterization of a monoclonal antibody specific to the M serotype of plum pox potyvirus. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 477–480.
- CABI. 2011. Crop Protection Compendium. <http://www.cabi.org/cpc/>, accessed 26 October 2011.
- Cambra, M., Asensio, M., Gorris, M.T., Pérez, E., Camarasa, E., García, J.A., Moya, J.J., López-Abella, D., Vela, C. & Sanz, A. 1994. Detection of plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 24: 569–577.
- Cambra, M., Boscia, D., Myrta, A., Palkovics, L., Navrátil, M., Barba, M., Gorris, M.T. & Capote, N. 2006a. Detection and characterization of *Plum pox virus*: serological methods. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 254–261.
- Cambra, M., Capote, N., Myrta, A. & Llácer, G. 2006b. *Plum pox virus* and the estimated costs associated with sharka disease. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 202–204.
- Cambra, M., Capote, N., Olmos, A., Bertolini, E., Gorris, M.T., Africander, N.L., Levy, L., Lenardon, S.L., Clover, G. & Wright, D. 2006bc. Proposal for a new international protocol for detection and identification of *Plum pox virus*. Validation of the techniques. *Acta Horticulturae*, 781: 181–191.
- Candresse, T. & Cambra, M. 2006. Causal agent of sharka disease: historical perspective and current status of *Plum pox virus* strains. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 239–246.
- Capote, N., Bertolini, E., Olmos, A., Vidal, E., Martínez, M.C. & Cambra, M. 2009. Direct sample preparation methods for detection of *Plum pox virus* by real-time RT-PCR. *International Microbiology*, 12: 1–6.
- Capote, N., Gorris, M.T., Martínez, M.C., Asensio, M., Olmos, A. & Cambra, M. 2006. Interference between D and M types of *Plum pox virus* in Japanese plum assessed by specific monoclonal antibodies and quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 96: 320–325.
- Damsteegt, V.D., Scorza, R., Stone, A.L., Schneider, W.L., Webb, K., Demuth, M. & Gildow, F.E. 2007. *Prunus* host range of *Plum pox virus* (PPV) in the United States by aphid and graft inoculation. *Plant Disease*, 91: 18–23.
- Damsteegt, V.D., Waterworth, H.E., Mink, G.I., Howell, W.E. & Levy, L. 1997. *Prunus tomentosa* as a diagnostic host for detection of *Plum pox virus* and other *Prunus* viruses. *Plant Disease*, 81: 329–332.
- Desvignes, J.C. 1999. *Virus diseases of fruit trees*. Paris, CTIFL, Centr'imprint. 202 pp.
- EPPO. 2004. Diagnostic protocol for regulated pests: *Plum pox potyvirus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 34: 247–256.
- EPPO. 2006. Current status of *Plum pox virus* and sharka disease worldwide. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 205–218.
- García, J.A. & Cambra, M. 2007. *Plum pox virus* and sharka disease. *Plant Viruses*, 1: 69–79.
- Gentit, P. 2006. Detection of *Plum pox virus*: biological methods. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 251–253.
- ISPM 27. 2006. *Diagnostic protocols for regulated pests*. Rome, IPPC, FAO.
- ISPM 31. 2008. *Methodologies for sampling of consignments*. Rome, IPPC, FAO.
- James, D. & Glasa, M. 2006. Causal agent of sharka disease: New and emerging events associated with *Plum pox virus* characterization. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 247–250.

- Karsai, A., Müller, S., Platz, S. & Hauser, M.T.** 2002. Evaluation of a homemade SYBR Green I reaction mixture for real-time PCR quantification of gene expression. *Biotechniques*, 32: 790–796.
- Levy, L. & Hadidi, A.** 1994. A simple and rapid method for processing tissue infected with plum pox potyvirus for use with specific 3' non-coding region RT-PCR assays. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 24: 595–604.
- Myrta, A., Potere, O., Boscia, D., Candresse, T., Cambra, M. & Savino, V.** 1998. Production of a monoclonal antibody specific to the El Amar strain of plum pox virus. *Acta Virologica*, 42: 248–250.
- Myrta, A., Potere, O., Crescenzi, A., Nuzzaci, M. & Boscia, D.** 2000. Production of two monoclonal antibodies specific to cherry strain of plum pox virus (PPV-C). *Journal of Plant Pathology*, 82 (suppl. 2): 95–103.
- Olmos, A., Bertolini, E. & Cambra, M.** 2002. Simultaneous and co-operational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods*, 106: 51–59.
- Olmos, A., Bertolini, E., Gil, M. & Cambra, M.** 2005. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods*, 128: 151–155.
- Olmos, A., Cambra, M., Dasi, M.A., Candresse, T., Esteban, O., Gorris, M.T. & Asensio, M.** 1997. Simultaneous detection and typing of plum pox potyvirus (PPV) isolates by heminested-PCR and PCR-ELISA. *Journal of Virological Methods*, 68: 127–137.
- Olmos, A., Capote, N., Bertolini, E. & Cambra, M.** 2007. Molecular diagnostic methods for plant viruses. In: Z.K. Punja, S. DeBoer and H. Sanfacon, eds. *Biotechnology and plant disease management*, pp. 227–249. Wallingford, UK and Cambridge, USA, CAB International. 574 pp.
- Osman, F. & Rowhani, A.** 2006. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods*, 133: 130–136.
- PaDIL.** 2011. <http://old.padil.gov.au/pbt/>, accessed 26 October 2011.
- Schneider, W.L., Sherman, D.J., Stone, A.L., Damsteegt, V.D. & Frederick, R.D.** 2004. Specific detection and quantification of *Plum pox virus* by real-time fluorescent reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods*, 120: 97–105.
- Šubr, Z., Pittnerova, S. & Glasa, M.** 2004. A simplified RT-PCR-based detection of recombinant *Plum pox virus* isolates. *Acta Virologica*, 48: 173–176.
- Ulubaş Serçe, Ç., Candresse, T., Svanella-Dumas, L., Krizbai, L., Gazel, M. & Çağlayan, K.** 2009. Further characterization of a new recombinant group of *Plum pox virus* isolates, PPV-T, found in the Ankara province of Turkey. *Virus Research*, 142: 121–126.
- Varga, A. & James, D.** 2005. Detection and differentiation of *Plum pox virus* using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing. *Journal of Virological Methods*, 123: 213–220.
- Varga, A. & James, D.** 2006. Real-time RT-PCR and SYBR Green I melting curve analysis for the identification of *Plum pox virus* strains C, EA, and W: Effect of amplicon size, melt rate, and dye translocation. *Journal of Virological Methods*, 132: 146–153.
- Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M. & Dunez, J.** 1992. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, 39: 27–37.
- Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M. & Dunez, J.** 1991. A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, 33: 355–365.